

## 临床研究

## 荧光原位杂交技术在肺癌痰细胞学诊断中的应用

贾东辉 张智慧 刘树范 程书钧

**【摘要】** 目的 探讨荧光原位杂交技术(FISH)在肺癌痰细胞学诊断中的应用。方法 用 7 号、11 号、17 号、X 染色体特异的着丝粒 DNA 探针,对 30 例肺癌痰标本进行双色 FISH。结果 30 例痰标本中,有 23 例为阳性痰,7 号、17 号、X、11 号染色体出现超二倍体改变者分别为 65.2% (15/23)、60.9% (14/23)、52.2% (12/23)和 39.1% (9/23)。在 7 例细胞学诊断为可疑癌的痰标本中,出现 7 号染色体超二倍体改变者达到 57.1% (4/7)。结论 FISH 不仅可以检测痰标本中的异倍体肿瘤细胞,而且也可以作为痰细胞学诊断的辅助技术。

**【主题词】** 肺肿瘤; 原位杂交; 痰标本; 超二倍体

Application of fluorescence in situ hybridization (FISH) in sputum cytologic diagnosis of lung cancer JIA Donghui, ZHANG Zhihui, LIU Shufan, et al. Cancer Institute (Hospital), Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100021, China

**【Abstract】 Objective** To study the numerical chromosomal abnormalities of cells in sputum from patients with lung cancer by dual-fluorescence in situ hybridization (FISH). **Methods** Thirty sputum samples from lung cancer patients were examined by FISH with centromere DNA probes of chromosome 7, 11, 17 and X. **Results** In 23 positive sputum samples studied, the frequency of hyperdiploid of chromosome 7, 17, X and 11 was 65.2% (15/23), 60.9% (14/23), 52.2% (12/23) and 39.1% (9/23), respectively. Hyperdiploidy of chromosome 7 was found in 4 of 7 sputum samples which were cytologically suspicious of cancer cells. **Conclusion** FISH can detect aneuploid malignant cells in sputum and be used as a complementary technique to cytologic diagnosis of lung cancer.

**【Subject words】** Lung neoplasms; Situ hybridization; Sputum samples; Hyperdiploid

目前肺癌的发生率和死亡率呈逐年上升趋势。临床对肺癌进行诊断方法有痰细胞学检查、胸部 X 线检查、CT 检查、支气管镜检查 and 肺部穿刺活检等。与其他方法比较,痰细胞学检查的标本取材制备简单,患者无创伤,经济,结果可靠。有文献报道,通过痰细胞学诊断出的肺癌患者 5 年生存率为 80%,而以其他方法诊断的肺癌患者 5 年生存率只有 10%<sup>[1]</sup>。由此可见,痰细胞学检查对提高肺癌患者的 5 年生存率具有重要意义。然而,痰细胞学诊断的敏感性和特异性有待提高。随着分子生物学技术的发展,越来越多的技术被应用于肿瘤遗传学研究。荧光原位杂交技术(FISH)适用于检测单个细胞的 DNA 变异,它可以在细胞处于间期时对细胞进行遗传学分析,即间期细胞遗传学<sup>[2,3]</sup>。我们利用 FISH

技术,对 30 例痰标本的间期细胞进行了研究,以期发现肺癌细胞染色体变异改变规律,并探讨对痰细胞诊断具有辅助作用的指标。

## 材料与方法

1. 肺癌痰标本:由我室提供,共 30 例。每例标本均由两位细胞学医师进行细胞学诊断。

2. 痰标本的制备:参考 Saccomanno 等<sup>[4]</sup>的方法并进行了改进。将新鲜痰放入装有 Saccomanno 固定液的试管中固定。用搅棒将痰搅匀,离心弃上清。0.25%胰蛋白酶室温消化 10 min 后,用血清终止消化,离心弃上清。PBS 洗涤,离心弃上清。用 Saccomanno 固定液重悬细胞,滴在载玻片上。

3. 探针、标记及检测试剂:我们选择 7 号、11 号、17 号、X 染色体为研究对象进行标记、监测(表 1)。

4. 杂交:(1)探针杂交液混合物配制:杂交前将标记好的探针用杂交液(55%甲酰胺、1×SSC、10%

基金项目:国家重点基础研究经费资助项目(G1998051200)

作者单位:100021 北京,中国医学科学院中国协和医科大学肿瘤医院肿瘤临床细胞学室

表 1 双色 FISH 中染色体 DNA 探针的标记和检测

组别	染色体	标记试剂	检测试剂	信号颜色
A	17	Digoxigenin-11-dUTP	Anti-digoxigenin-Rhodamine	红
	11	Biotin-16-dUTP	Avidin-FITC	绿
B	X	Digoxigenin-11-dUTP	Anti-digoxigenin-Rhodamine	红
	7	Biotin-16-dUTP	Avidin-FITC	绿

硫酸葡聚糖、1 mg/ml 鲑鱼精 DNA) 配成 20 ng/ml 的杂交混合物。(2) 探针变性: 配好的探针杂交液混合物于 75℃ 水浴变性 10 min, 变性后立即入冰。(3) 杂交前标本的处理: 70% 乙酸处理 10 min, PBS 洗 5 min, 共 3 次。乙醇梯度脱水, 风干。70% 甲酰胺 - 2 × SSC 中 75℃ 变性 4 min, 立即入冷 70%、90%、100% 乙醇脱水各 3 min, 风干。(4) 杂交: 将变性过的探针加到上述变性的标本上, rubber solution 封片, 置温盒中于 37℃ 杂交过夜。(5) 杂交后洗涤: 杂交完毕后, 片子在 42℃ 的 50% 甲酰胺 - 2 × SSC 中洗 5 min, 共 3 次, 2 × SSC 中洗 5 min, 共 3 次。(6) 检测: 室温下在 4 × SSCT (4 × SSC - 0.1% Tween 20) 中洗 3 min。加 4 × SSCB (4 × SSCB - 0.5% blocking reagent-0.02% NaN<sub>3</sub>, Boehringer mannheim 公司) 室温封闭 20 min。加 Avidin-FITC (5 μg/ml - 4 × SSCB, Vector laboratories 公司) 室温封闭 20 min。置温盒中于 37℃ 孵育 40 ~ 60 min。4 × SSCT 洗 5 min, 共 3 次。加 biotinylated goat anti-avidin 抗体 (5 μg/ml - 4 × SSCB, Vector laboratories 公司) 置温盒中于 37℃ 孵育 40 min。4 × SSCT 洗 5 min, 共 3 次。加 Avidin-FITC (5 μg/ml - 4 × SSCB) 与 Anti-digoxigenin rhodamine (20 μl/ml, Boehringer mannheim 公司) 的混合液, 置温盒中于 37℃ 孵育 40 min。4 × SSCT 洗 5 min, 共 3 次。梯度乙醇脱水, 风干。加 DAPI 复染。

5. 对照研究: 上述 4 个染色体特异探针与 6 例健康人 (其中男性 3 例, 女性 3 例) 的外周血细胞中期分裂染色体杂交, 以确证各探针杂交的特异性, 并计数 400 个细胞中具有 ≤ 1 个杂交信号和 ≥ 3 个杂交信号的细胞比例, 用以计算每个探针具有 ≤ 1 个杂交信号和 ≥ 3 个杂交信号的细胞的 99% 可信限 (上限), 作为判定标本中异倍体的标准。我们选择具有某一杂交信号异常数目的细胞所占的比例 ≥ 10% 作为判定异倍体的标准, 这与文献 [5] 判定异倍体的标准是一致的。

6. 质量控制: 每一批杂交实验都带一张正常血细胞的染色体片。若杂交后, 正常染色体片中各探针具有 2 个杂交信号 (男性中 X 染色体为一个信号)

的比例明显低于对照研究中的平均比例, 或杂交信号很弱, 难以辨别, 则视该次杂交失败, 弃之重新杂交。

7. 镜下观察并计数: 杂交后用 Nikon 荧光显微镜配以 FITC 和 TEXAS-RED 和 DAPI 三色滤光片观察结果, 用 Ectaschrome 400ASA 彩色负片摄影记录。杂交信号的判定参照 Hoppman 等 [6] 所描述的标准, 每一个标本在计数 100 个细胞中两探针具有的杂交信号的数目, 并计算其占总计数细胞的百分比。破损、重叠、边界不清、具有明显非特异性杂交背景和信号模糊不清的细胞不计数在内。

### 结果与讨论

4 个染色体探针在 30 例肺癌痰标本中的杂交结果见表 2。

间期细胞遗传学是近年发展起来的一门技术, 其最大优点是不需细胞培养便可以在细胞处于间期时进行遗传学分析, 而且即使细胞的数目极少也可以。我们采用人染色体特异着丝粒探针对痰细胞学标本进行 FISH, 间期核中染色体特异杂交信号减少, 则认为该染色数目减少, 反之则增多。以往细胞遗传学研究表明, 染色体数目改变在人类肿瘤是常见的现象, 染色体数目异常在恶性肿瘤中所占的比例远远多于良性病变。对肺癌进行细胞遗传学分析不仅可以揭示特异的染色体变异, 而且这些变化对肺癌的诊断和判断预后也有重要的参考价值。

在 30 例痰标本中, 有 23 例为阳性痰 (图 1, 2)。7 号、17 号、X 和 11 号染色体出现超二倍体的改变者分别为 65.2% (15/23)、60.9% (14/23)、52.2% (12/23) 和 39.1% (9/23)。在 7 例细胞学诊断为可疑癌的痰标本中, 出现 7 号染色体超二倍体改变者达 57.1% (4/7)。由此可见, 染色体超二倍体是恶性细胞的主要特点, 用 FISH 技术检测染色体超二倍体来确证传统细胞学不能肯定的肿瘤细胞具有一定的可行性。据有关文献报道, 恶性胸水标本超二倍体病例所占的比例数稍低 [7, 8]。其原因为: (1) 痰标本中非肿瘤细胞, 如淋巴细胞、吞噬细胞占的比例大。(2) 痰标本中黏液不容易被彻底去除, 且其中存在大量脱落的口腔上皮细胞, 从而影响了细胞的分散及杂交。提高痰标本杂交效率, 制备出高质量痰标本是极其必要的。Voravud 等 [9] 在接近头颈恶性肿瘤而形态学正常的上皮中, 有 FISH 检测出 7 号及 17 号染色体多倍体。这提示我们, 如果细胞学没有检

表 2 30例肺癌痰标本染色体改变情况

例号	性别	细胞学诊断	其他诊断	7号染色体	11号染色体	17号染色体	X染色体
1	男	癌	胸水细胞学诊断:癌	0	0	0	0
2	男	腺癌		+	+	+	+
3	女	癌	胸片、CT:右肺中叶癌	+	-	+	+
4	男	癌	胸片、CT:左肺癌,肺内多发转移	+	-	+	+
5	男	腺癌		+	+	+	+
6	男	小细胞未分化癌		0	0	0	0
7	男	癌		-	0	+	-
8	男	腺癌	胸片、CT:右上肺癌伴双肺、纵隔淋巴结转移	+	0	+	0
9	男	腺癌	支气管镜:右主支气管外侧壁见肿物	0	0	0	+
10	男	小细胞未分化癌		+	+	+	+
11	女	鳞癌	胸片、CT:左肺上叶癌	-	0	-	0
12	女	腺癌	胸片、CT:左肺上叶癌	0	-	0	-
13	男	小细胞未分化癌	病理:(右下肺)小细胞肺癌	+	+	+	+
14	男	小细胞未分化癌		0	0	+	0
15	女	癌	肺穿刺细胞学:癌	0	0	0	0
16	男	癌	病理:(右肺上叶)中分化鳞癌	+	+	+	+
17	男	鳞癌	病理:(左肺下叶)中低分化鳞癌	+	+	+	+
18	男	腺癌	病理:(左肺)中低分化鳞癌	+	+	+	+
19	男	癌	胸片、CT:右肺上叶结节,考虑转移癌	+	+	-	0
20	女	鳞癌	病理:(左肺上叶)低分化腺癌	+	+	+	+
21	男	腺癌		+	0	-/+	+
22	男	腺癌	病理:(右肺上叶)中分化腺癌	+	-	0	-
23	男	腺癌	病理:(左肺上叶)腺癌	+	-	-	0
24	男	可疑癌	病理:(右肺下叶)鳞癌	0	-	0	0
25	男	可疑癌	右锁骨上淋巴结穿刺:癌	+	0	+	-
26	男	可疑鳞癌	胸片、CT:右肺上叶癌	0	0	0	0
27	男	可疑鳞癌		+	+	0	0
28	男	可疑鳞癌	病理:(右肺上叶)中低分化鳞癌	+	+	+	+
29	男	可疑鳞癌	病理:(右肺下叶)中低分化鳞癌	+	+	+	+
30	男	可疑鳞癌	锁骨上淋巴结穿刺:恶性细胞	-	0	0	-

注:+:超二倍体;-:低二倍体;0:二倍体

查出痰标本中具有恶性特征的细胞,但是用 FISH 技术却检测出细胞有染色体异倍体改变,就要考虑这例标本是否是肺癌早期阶段或癌前病变。

从本研究结果可以看出,肺癌痰标本中有 7 号、17 号、X 染色体超二倍体改变的肿瘤细胞占相当大的比例。因此,用 FISH 技术检测细胞染色体异倍体改变对痰标本的细胞学诊断具有一定的参考价值。

(本文图 1,2 见插页第 18 页)

## 参 考 文 献

- 1 Bechtel JJ, Kelley WR, Petty TL, et al. Outcome of 51 patients with roentgenographically occult lung cancer detected by sputum cytologic testing: a community hospital program. Arch Intern Med, 1994, 154: 975-980.
- 2 Wolman SR. Application of fluorescence in situ hybridization techniques in cytopathology. Cancer Cytopathol, 1998, 4: 193-197.
- 3 Abati A, Sanford JS, Fertsch P, et al. Fluorescence in situ hybridization

(FISH): a user guide to optimal preparation of cytologic specimens. Diagn Cytopathol, 1995, 13: 468-492.

- 4 Saccomanno G, Saunderson RP, Ellis H, et al. Concentration of carcinoma or atypical cells in sputum. Acta Cytol, 1963, 7: 305-315.
- 5 Afify A, Mark HFL. Fluorescence in situ hybridization assessment of chromosome 8 copy number in stage I and stage II infiltrating ductal carcinoma of the breast. Cancer Genet Cytogenet, 1997, 97: 101-105.
- 6 Hoppman ANH, Moesler O, Smeets AWGB, et al. Numerical chromosome 1, 7, 9, and 11 aberrations in bladder cancer detected by in situ hybridization. Cancer Res, 1992, 51: 644-651.
- 7 Florentin BD, Sanchez M, Raza A, et al. Detection of hyperdiploid malignant cells in body cavity effusion by fluorescence in situ hybridization on thinPrep slides. Cancer Genet Cytogenet, 1997, 81: 299-308.
- 8 Cajulis RS, Yu G, Gokaslan S, et al. Modified interphase cytogenetics technique as an adjunct in the analysis of atypical cell in body fluids. Diagn Cytopathol, 1997, 16: 331-335.
- 9 Voravud N, Shin DM, Ro JY, et al. Increased polysomies of chromosomes 7 and 17 during head and neck multistage tumorigenesis. Cancer Res, 1993, 53: 2874-2883.

(收稿日期:1999-07-29)